



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان:

جداسازی، شناسایی مولکولی و معرفی فراکسیون اکتینومیسست های مهارکننده سویه های

پاتوژن قارچی مقاوم به دارو جدا شده از نمونه های بالینی

توسط:

ساناز هادی زاده

اساتید راهنما:

دکتر سید امین آیت الهی موسوی

دکتر حمید فروتن فر

استاد مشاور:

دکتر غلامحسین شهیدی

دکتر حمید بدلی

سال تحصیلی: ۱۳۹۴-۱۳۹۳



**Isolation, molecular identification & Introducing fraction of
Actinomycetes able to inhibit clinically drug-resistant fungal
pathogens**

A Thesis Presented to The Graduate Studies

By:

Sanaz Hadizadeh

Supervisors:

Dr. Seyyed Amin Ayatollahi Mousavi

Dr. Hamid Forootanfar

Advisors:

Dr. Gholamhossein Shahidi

Dr. Hamid Badali

Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science in:

Medical Mycology

Kerman University of Medical Science

September 2015

چکیده

جداسازی، شناسایی مولکولی و معرفی فراکسیون های اکتینومیست های مهارکننده سوبه های پاتوژن قارچی مقاوم به دارو از نمونه های بالینی

مقدمه و هدف: در حال حاضر اهمیت قارچ ها از نظر پزشکی به عنوان پاتوژن های انسانی در جهان برکسی پوشیده نیست. امروزه شمار بیماری های قارچی رنج می برند و به خصوص بروز عفونت های فرصت طلب در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی، رو به افزایش است. از طرفی قارچها ماهیت یوکاریوتی دارند و یافتن داروهای ضد قارچی با سمیت انتخابی بر میزبان آسان نیست. در این بین، انسیدانس ولووواژینیت^۱ کاندیدایی ایجاد شده توسط گونه های کاندیدایی غیرآلیکس روند رو به افزایشی دارد. بیشتر این گونه ها دارای حداقل غلظت مهارکننده (MIC)^۲ بالاتری نسبت به آزول ها هستند و درمان عفونت ایجاد شده توسط آنها اغلب مشکل می باشد. علی رغم توسعه داروهای ضد قارچی و به دلیل افزایش بروز مقاومت دارویی، افزایش MIC و انتقال مقاومت^۳ در میان ایزوله های آسپرژیلوس، میزان مرگ و میر عفونت های فرصت طلب و مهاجم ناشی از گونه های آسپرژیلوس افزایش یافته است. در بین منابع تولیدکننده داروهای ضد قارچی، اکتینومیست ها همواره به عنوان یک منبع اصلی تولیدکننده آنتی بیوتیک های جدید و متابولیت های ثانویه متنوع، در داروسازی مورد توجه بوده اند. مطالعات گسترده برای به دست آوردن آنتی بیوتیک های جدید از اکتینومیست ها با اثرات بهتر و سمیت کمتر بر میزبان، ادامه دارد. این مطالعه با هدف تعیین اثرات ضد قارچی اکتینومیست های خاکری بر علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی شده از نمونه برونکوآلوئولار لاواژ (BAL)^۴ و کاندیدا تروپیکاليس شناسایی شده از نمونه واژن که مقاومت به داروهای ضد قارچی در این گونه به اثبات رسیده، انجام گرفت و نیز شناسایی مولکولی اکتینومیست های جدا شده از خاک با استفاده از ژن SrDNA^{۱۶} انجام شد.

مواد و روش: قارچ های مورد مطالعه از نمونه های ارسالی به آزمایشگاه قارچ شناسی، شامل ۵۰ نمونه های واژن و BAL که به روش های روتین میکروسکوپی، ماکروسکوپی و روش های تشخیصی محیط رنگی کروم آگار و همچنین شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفته شد. جهت یافتن عوامل ضد قارچی جدید بر علیه این پاتوژن ها، ۱۰۰ ایزوله اکتینومیست خاکری از خاک های مختلف استان کرمان از جنبه آنتاگونیستی علیه این قارچ ها مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپ الکترونیکی و بررسی خواص فیزیولوژیک در این آنتاگونیست ها از قبیل فعالیت لیپازی، آمیلاز، پروتئاز و کیتینازی ایزوله های فعال بر حسب پروتوکل های مربوطه انجام پذیرفت. جهت شناسایی مولکولی، ابتدا، DNA ژنومیک از باکتری های منتخب

^۱ Vulvovaginal candidiasis

^۲ Minimum Inhibitory Contration

^۳ Cross- resistance

^۴ Bronchoalveolar lavage

استخراج، و ژن ۱۶SrDNA این ایزوله تکثیر و توالی یابی شد. نتایج با استفاده از برنامه های بیوانفورماتیک آنالیز شده و ایزوله های مذکور شناسایی شدند.

یافته ها: نتایج حاصل از بررسی های میکروسکوپی و ماکروسکوپی از نمونه های بالینی آسپرژیلوس فومیگاتوس مقاوم به دارو از نمونه BAL و گونه غیر البیکنس، کاندیدا تروپیکالیس مقاوم به دارو ضد قارچی از نمونه واژن جداسازی و شناسایی شدند. از میان ایزوله های آنتاگونیست براساس اندازه هاله ممانعت از رشد قارچ ایزوله های *Actinomyces spp. kp137825* بر علیه کاندیدا تروپیکالیس و *Actinomyces spp. kp137826* بر علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس، به عنوان ایزوله های فعال اکتینومیست و مناسب بیوکنترل انتخاب شدند. نتایج توالی یابی نشان داد، ایزوله *Actinomyces spp. kp137826* مشابه با توالی ایزوله ی *Streptomyces rochei AK 39* بوده است. *Actinomyces spp. kp137825* به عنوان یکی از گونه های جدید که برای اولین بار تعیین توالی شده شناخته شد.

نتیجه گیری: یافته های این پژوهش نشان می دهد که اکتینومیست های خاکری فوق دارای اثرات ضد قارچی می باشند. بنابراین می توان امیدوار بود که در آینده با جایگزین کردن این عوامل به جای داروهای ضد قارچی شیمیایی که عوارض جانبی زیادی دارند، بتوان عفونت های قارچی فرصت طلب همچون عفونت های ناشی از گونه های کاندیدا و آسپرژیلوس مقاوم به دارو را در عرصه ی داروسازی، کنترل و درمان کرد.

کلمات کلیدی: عفونت های قارچی فرصت طلب، عفونت های قارچی مقاوم به دارو، آسپرژیلوس فومیگاتوس، کاندیدا تروپیکالیس، اکتینومیست های خاکری، ایزوله های فعال اکتینومیست، شناسایی مولکولی، ژن ۱۶SrDNA.

Isolation, molecular identification & Introducing fraction of Actinomycetes able to inhibit clinically drug-resistant fungal pathogens

Abstract

Background and Aim: The number of patients who suffer from fungal diseases, particularly the incidence of opportunistic infections in immunocompromised patients, is growing. Fungi are eukaryote, therefore, it is difficult to find out compounds that selectively inhibit fungal metabolism and exhibiting no toxicity to human. Mean while, the incidence of vulvovaginal Candidiasis caused by *Non-Candida albicans* is increasing. Most of these species have no sensitivity against azoles and are often difficult to treat them. Despite the expanding number of antifungal agents, death rate caused by *Aspergillus* species has been increased during the recent decades due to drug-resistance occurrence, increased minimum inhibitory concentration (MIC) and cross-resistance among isolates. Actinomycetes were always considered as a source of essential new antibiotic producers and secondary metabolite in pharmaceutical industries. Extensive studies to obtain new antibiotics from Actinomycetes with better and less toxic effect on the host, continues. The aim of this study was to isolate antibiotic producing terrestrial *Actinomycetes* spp against clinically isolated drug-resistant *Aspergillus fumigatus* and *Candida tropicalis* and molecular identification of active Actinomycete isolates by PCR (Polymerase Chain Reaction).

Materials and Methods: 50 clinical samples were collected from patients treated with azoles. Samples including vaginal and Broncho alveolar lavage (BAL) were sent to mycology laboratories, were routinely screened for the presence of azole resistance ones. Fungal infections were identified microscopy and macroscopy. 100 Soil samples of Actinomycetes were collected from different locations in and around kerman. Then, they were evaluated for their antagonistic activity against the studied fungi. Physiological properties of isolates e.g., lipase, amylase, protease and chitinase activity were performed according to the relevant protocols.

Results: Most isolates from BAL samples were identified *Aspergillus* spp. Among them, only *A.fumigatus* exhibited resistance to azoles (Clotrimazole, Itraconazole and Viconazole). *Candida* sp. isolated from vaginal samples and *C.tropicalis* was the only one that exhibited azoles resistance. *Actinomycete* sp. (kp137826) and *Actinomycete* sp. (kp137825) exhibited antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida tropicalis*, respectively. Actinomycetes sequence have been compared to sequences in GenBank. Nucleotide analysis showed that isolate *Actinomycete* spp. kp137826 had similarity to *Streptomyces rochei* AK 39 and *Actinomycete* spp. kp137825 is newly strain.

Conclusion: The findings of this research showed that soil-isolates *Streptomyces* have antifungal activity against *C.tropicalis* and *A.fumigatus*. This study was the first step for finding the novel antifungal agents versus mentioned fungi. Development of such principles highlights a long way to reality of production of an antifungal antibiotic. Elucidation of molecular structures of active principles, evaluation of laboratory animals from the stand point

of short and long term side effects, carcinogenic and teratogenic effects, environmental impacts, and topical evaluation on volunteer humans are all necessary main steps which should be critically evaluated before any real conclusion about active Actinomycete isolates.

Keywords: Fungus, *Aspergillus fumigatus*, *Candidia tropicalis*, Antifungal activity, Actinomycete